Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Fachrichtung Mikrobiologie

Versuch einer serologischen Einordnung von 107 Clostridium welchii (perfringens) Typ A-Stämmen verschiedenen Ursprungs in die Subtypen 1-13 von B. Hobbs

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hinrich Thiede
Tierarzt aus Stettin

Berlin 1975
Journal - Nr. 856

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0091

Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Fachrichtung Mikrobiologie

Versuch einer serologischen Einordnung von 107 Clostridium welchii (perfringens) Typ A-Stämmen verschiedenen Ursprungs in die Subtypen 1-13 von B. Hobbs

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hinrich Thiede
Tierarzt aus Stettin

Berlin 1975
Journal - Nr. 856

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichsvorsitzender:	Prof. Dr. H. Loppnow
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 27.1.1975

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. LITERATUR	6
2.1. A-Subtypstämme des Cl. welchii nach HOBBS	6
2.2. Hitzeresistenztest	9
2.3. Serologische Untersuchung	10
2.4. Zahl der typisierbaren Stämme	12
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
3.1. Stämme	13
3.2. Versuchstiere	15
4. TECHNIK UND METHODEN	16
4.1. Behandlung der 107 Stämme	16
4.2. Behandlung der Hobbs-Stämme	17
4.3. Gewinnung der Antigene	18
4.4. Gewinnung der Antiseren	19
4.5. Röhrchenagglutination	19
4.6. Technik des Erhitzungstestes	21
4.7. Homologe Endtiter der mit den 13 Hobbs-Typstämmen hergestellten Antiseren	22
5. ERGEBNISSE	24
5.1. Bewertungsnormen für die Ergebnisse der Agglutination	24
5.2. 50 T-Stämme	25
5.3. 21 W-Stämme	26
5.4. 8 S-Stämme	27
5.5. 8 I-Stämme	28
5.6. 20 Z-Stämme	29
6. DISKUSSION	30
7. ZUSAMMENFASSUNG	35
8. SUMMARY	37
9. LITERATURVERZEICHNIS	39

1. EINLEITUNG

107 Stämme des Clostridium (Cl.) welchii (perfringens) Typ A, die aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien isoliert worden waren, sollten daraufhin geprüft werden, ob sich die Stämme serologisch in die 13 Subtypen von Betty C. HOBBS einordnen lassen.

Wie durch Arbeiten von HOBBS et al. (12) sowie SUTTON und HOBBS (24) gezeigt wurde, bietet eine Antigenanalyse die Möglichkeit, die Ursache von Lebensmittelvergiftungen, die durch A-Stämme des Cl. welchii verursacht worden sind, aufzuklären. Dabei wird davon ausgegangen, daß ein Kausalkonnex zwischen dem Genuß des Lebensmittels und der Erkrankung der Menschen besteht, wenn die aus verdächtigen Lebensmitteln und Stuhlproben der erkrankten Menschen isolierten Cl. welchii Typ A-Stämme antigen übereinstimmen.

Da die 107 Cl. welchii Typ A-Stämme unterschiedlichen Ursprungs waren, interessierte besonders die Frage, ob die Typisierbarkeit von der Art der Untersuchungsmaterialien, aus denen die Stämme gewonnen wurden, abhängig ist.

2. LITERATUR

2.1. A-Subtypstämme des Cl. welchii nach HOBBS

Nachdem in früherer Zeit durch mehrere Autoren (Lit. s. WILLIS (26), S. 115) versucht worden war, mit der Agglutination die Stämme des Cl. welchii zu klassifizieren und sich dabei ergeben hatte, daß dieses Verfahren für die Klassifizierung ungeeignet ist, gelang es HENDERSON (11) und RODWELL (22) festzustellen, daß das somatische Antigen der klassischen A-Stämme in seiner Spezifität bei der Agglutination eine erhebliche Verschiedenheit zeigt, jedoch stammesspezifische Eigenschaften besitzt, die sich für einen Nachweis serologischer Subtypen eignen.

RODWELL erweiterte die Untersuchungen von HENDERSON insofern, als er nicht nur die Agglutination, sondern auch die Präzipitation anwendete. Der Autor stellte bei diesen beiden Untersuchungsmethoden eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse fest.

Eine Zuordnung von A-Stämmen aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen bei Menschen zu einem bestimmten Subtyp schien nach den Untersuchungen von HOBBS et al. (12) möglich zu sein.

Diese Autoren stellten mit A-Stämmen des Cl. welchii, die bei Lebensmittelvergiftungen aus Faecesproben erkrankter Menschen und Lebensmitteln isoliert worden waren, über Kaninchen Antiseren her und testeten mit diesen Seren die bei anderen Lebensmittelvergiftungsfällen aus Lebensmitteln und Faeces erkrankter Menschen isolierten A-Stämme.

Zuerst wurden mit 8 Subtypen ("provisional subtypes") Antiseren gewonnen und diese für eine Zuordnung bei Lebensmittelvergiftungen neu isolierter Stämme eingesetzt. Später erhöhten HOBBS (13) diese Zahl auf 13 und SUTTON und HOBBS (24) auf 17 Subtypen.

In den meisten Fällen wurden die 13 Subtypen von HOBBS benutzt, wenn es darum ging, die aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen isolierten Cl. welchii-Keime serologisch einzuordnen. BAUMGART et al. (2) bedienten sich ebenfalls der 13 Stämme für die Gewinnung von Antiseren, sandten ihre A-Stämme aber noch an HOBBS zwecks Kontrolluntersuchung. Diese Kontrolluntersuchung wurde im Jahre 1970 von HOBBS mit 17 Subtypstämmen durchgeführt und bestätigte die Ergebnisse, die BAUMGART et al. mit den 13 Subtyp-Antiseren erzielt hatten.

HOBBS et al. (12) bezeichneten die bei Lebensmittelvergiftungen isolierten Cl. welchii Typ A-Stämme als "atypische" Stämme im Unterschied zu den typischen oder klassischen A-Stämmen, die den Gasbrand bei Mensch und Tier hervorrufen.

Die atypischen A-Stämme unterscheiden sich von den typischen Stämmen der A-Gruppe durch Bildung geringer Mengen von alpha-Toxin. Sie produzieren wenig oder kein theta-Toxin und hitzeresistente Sporen, die ein Kochen während einer Stunde oder länger überstehen.

Diese Eigenschaften wurden später von HAUSCHILD et al. (8) und BAUMGART et al. (2) bei A-Stämmen, die Lebensmittelvergiftungen bei Menschen hervorgerufen hatten, nicht in vollem Umfang bestätigt. Es ergab sich vor allem, daß auch hitzelabile und "beta-hämolytische" oder hämolytische Cl. welchii Typ A-Stämme Lebensmittelvergiftungen beim Menschen verursachen können (Mc. KILLOP (19); Mc. NICOL und Mc.KILLOP (18); BAUMGART et al. (2)). Auch in der Eigenschaft, die stammesspezifischen Toxine in geringer Menge oder überhaupt nicht zu bilden, kam es zu unterschiedlichen Feststellungen.

Nach HOBBS et al. (12) haben hitzeresistente Stämme besondere Möglichkeiten, Lebensmittelvergiftungen hervorzurufen, da die Stämme durch die beim Zubereiten oder Aufwärmen von Speisen und Gerichten angewendeten Temperaturen nicht ab-

getötet werden und sich insbesondere beim Warmhalten der Speisen noch vermehren können.

Die Prüfung der Hitzeresistenz schien zunächst eine wichtige Voraussetzung zu sein, um A-Stämme überhaupt auf ihre serologische Zugehörigkeit zu einem der 13 Subtypstämme von HOBBS prüfen zu können. Diese Auffassung mußte einer Revision unterzogen werden, als sich herausstellte, daß auch hitzelabile A-Stämme Lebensmittelvergiftungen beim Menschen verursachen.

Die japanischen Autoren AKAMA und OTANI (1) fanden bei gesunden Menschen der japanischen Bevölkerung in Stuhlproben in jedem Fall Cl. welchii. Etwa die Hälfte der untersuchten Proben enthielt hitzeresistente Cl. welchii-Keime. Diese Keime kamen ferner permanent im Darm gesunder Japaner vor. Oft ließen sich mit den 13 Hobbs-Antiseren hitzeresistente A-Stämme typisieren, doch wurden in den Faecesproben einzelner Menschen mitunter auch 2 oder 3 verschiedene Hobbs-Subtypen gefunden. Ein Wechsel der Typen bei gleichen Personen kam gelegentlich vor.

Aus dem Jejunum toter Menschen konnten dreimal hitzesensitive Cl. welchii-Keime isoliert werden. Diese Keime wurden durch einzelne Hobbs-Antiseren agglutiniert. Die Toxigenität nicht typisierbarer Stämme war nach Meinung von AKAMA und OTANI von der Höhe und Dauer der Einwirkung der Temperatur bei der Isolierung abhängig. Hingegen schien diese Abhängigkeit bei den typisierbaren Stämmen nicht zu bestehen.

MIZUKAMI und TOMIKAWA (20) untersuchten Faecesproben von 74 gesunden Chinesen in Hongkong, wobei sie die Proben vorher 1 Stunde bei 100° C erhitzten. Es gelang ihnen, bei 40 Personen das Vorkommen hitzeresistenter Cl. welchii-Stämme nachzuweisen. 22 der bei diesen Menschen isolierten Stämme wurden in Sporulationsmedien von NISHIDA et al. (21) zur Sporulation gebracht und danach nochmals auf ihre

Hitzeresistenz überprüft. Nur 5 der [illegible] Stämme überstanden eine 10 Minuten lange Erhitzung bei Kochtemperatur.

2.2. Hitzeresistenztest

Der Nachweis der Hitzeresistenz wurde unterschiedlich gehandhabt:

Einige Autoren isolierten die Stämme aus dem vorher erhitzten Untersuchungsmaterial (Mc. CLUNG (16); DISCHE und ELEK (3); AKAMA und OTANI (1)). Andere Autoren überimpften die isolierten Stämme auf Sporulationsmedien und unterzogen die Stämme dann erst einer Erhitzung (HALL et al. (7); KATSARAS und SIEMS (15)) oder die Erhitzung wurde zunächst im Untersuchungsmaterial und später im Sporulationsmedium oder in cooked meat vorgenommen (HOBBS et al. (12); Mc. NICOL und Mc. KILLOP (18); Mc. KILLOP (19); TURNER und WONG (25); HAUSCHILD und THATCHER (9); MIZUKAMI und TOMIKAWA (20)).

Die Prüfung auf Hitzestabilität wurde von den Autoren in nahezu gleichartiger Weise durchgeführt. Es wurde stets Kochtemperatur angewendet, die Dauer der Erhitzung variierte zwischen 10, 15, 30, 45, 60 Minuten bis zu 5 Stunden. Die Definition für die hitzeresistenten und hitzelabilen Stämme ist in den einschlägigen Arbeiten nicht ganz eindeutig.

Nach SUTTON und HOBBS (24) sind solche Stämme hitzeresistent, die eine Erhitzung von 1 Stunde oder länger bei 100° C überstehen. Als hitzelabil werden hingegen diejenigen Stämme bezeichnet, die schon nach 15 Minuten langem Kochen abgetötet werden. Bei dieser Definition bleibt unklar, zu welcher Gruppe jene Stämme gehören, die eine Kochtemperatur von 16 bis 45 Minuten überstehen.

2.3. Serologische Untersuchung

Die Technik der serologischen Untersuchung war bei den Autoren HENDERSON (11), HOBBS et al. (12), HALL et al. (7), SUTTON und HOBBS (24), AKAMA und OTANI (1) sowie MIZUKAMI und TOMIKAWA (20) weitgehend ähnlich.

Für die Antiserumgewinnung mit den Subtypstämmen geben HOBBS et al. folgende Anweisung:

Die Stämme werden über Nacht bei 37° C auf vorher gekochter und abgekühlter Glukosebrühe kultiviert. Die Bazillen werden dann zweimal zentrifugiert und in destilliertem Wasser resuspendiert. Vor dem Gebrauch werden die Suspensionen 1 Stunde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit Dampf erhitzt oder mit 0,4 % Formalin über 2 Tage behandelt. In 2 - 3 Tagesintervallen werden die Kaninchen 6mal mit steigenden Mengen der Suspensionen i.v. injiziert. Es ließ sich feststellen, daß Formolsuspensionen höherwertige Antiseren ergaben als Suspensionen, die durch Hitze abgetötete Keime enthielten. Die unterschiedlichen immunogenen Eigenschaften wurden auf eine Schädigung des Antigens bei der Erhitzung zurückgeführt. Antigene Unterschiede ergaben sich jedoch zwischen beiden Suspensionen bei Absorptionstesten nicht.

Die Agglutination erfolgte entweder mit der Röhrchen- oder Objektträgeragglutination. Für die Routineuntersuchung empfehlen HOBBS et al. (12) die Objektträgeragglutination. Sie stellten mit ihren Typseren die Kochsalzverdünnungen 1 : 5 bis 1 : 25 her. Positive Stämme wurden bei diesen Verdünnungen unmittelbar nach Zusammenbringen mit homologen Antiseren agglutiniert. Bei vergleichenden Untersuchungen mit der Objektträger- und Röhrchenagglutination ergab sich, daß im Objektträgertest negativ reagierende Stämme im Röhrchentest niemals positive Reaktionen hervorriefen. Unspezifische Reaktionen kamen beim Objektträgertest nicht vor.

AKAMA und OTANI (1) benutzten für die Objektträgeragglutina-

tion eine Serumverdünnung von 1 : 3.. Bei positiver Agglutination frisch isolierter Stämme nahmen die Autoren eine Antigengleichheit an.

Die Röhrchenagglutination wurde, abgesehen von den Verdünnungsstufen der Antiseren und der Bewertung der Ergebnisse, von allen Autoren in gleicher Weise durchgeführt. HOBBS et al. (12) stellten die Serumverdünnungen 1 : 50 bis 1 : 3 200 und darüber her und bewerteten die Ergebnisse negativ, wenn eine Agglutination bei einer Typserumverdünnung von unter 1 : 50 nicht eintrat. Die 8 Typstämme zeigten mit den 8 Typ-Antiseren homologe Titer von 1 : 400 bis 1 : 3 200. Bei einzelnen Typseren (Hobbs 3 = H 3; Hobbs 4 = H 4; Hobbs 5 = H 5) kam es zu übergreifenden Reaktionen gegenüber anderen Typstämmen. Das Typserum H 4 reagierte beispielsweise gegenüber den Stämmen H 3 und H 4 bei gleichhohem Titer (1 : 400) positiv. Ebenso zeigte das Typ-Antiserum H 5 eine gleichstarke Agglutination gegenüber den Typstämmen H 3 und H 5. Das Typserum H 3 agglutinierte umgekehrt auch die Stämme H 4 und H 5. Jedoch waren die übergreifenden Titer niedriger als der homologe Titer.

HALL et al. (7) stellten mit den 13 Hobbs-Stämmen Antiseren her, die mit den homologen Stämmen Titer von 1 : 640 bis 1 : 2 560 zeigten. Die Autoren verlangen bei einer Antigengleichheit neu isolierter Stämme, daß diese die homologen Titer der 13 Hobbs-Typstämme erreichen. Bei Titern, die um eine Stufe niedriger oder höher als die homologen Titer lagen, wurde nicht angenommen, daß die Stämme mit den Subtypstämmen antigen übereinstimmten.

Welche Höhe der Titerstufen HAYASHI (10), BAUMGART et al. (2) sowie DOWELL und WHALEY (4) bei einer antigenen Übereinstimmung eigener Stämme mit den Hobbs-Subtypstämmen annahmen, ließ sich aus den Arbeiten dieser Autoren nicht ersehen.

2.4. Zahl der typisierbaren Stämme

SUTTON und HOBBS (24) konnten etwa 70 % der aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen isolierten Cl. welchii-Stämme mit ihren 13 "provisional subtype-strains" typisieren.

HALL et al. (7) untersuchten 28 A-Stämme aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen in den USA mit den Antiseren der 13 Hobbs-Typstämme. 12 der USA-Stämme konnten die Autoren typisieren, 16 Stämme ließen sich nicht serologisch einordnen.

DOWELL und WHALEY (4) untersuchten 3 000 Cl. welchii-Stämme aus 98 Fällen von Lebensmittelvergiftungen bei Menschen serologisch mit den 13 Subtyp-Antiseren von HOBBS und mit aus eigenen Stämmen hergestellten Antiseren. In 56 % der Fälle war es ihnen möglich, die Stämme serologisch einzuordnen, wobei sie insgesamt 19 Subtypseren benutzten.

BAUMGART et al. (2) isolierten bei einem Fall einer Lebensmittelvergiftung 38 Cl. welchii A-Stämme, 32 Stämme waren mit den Hobbs-Antiseren H 1, H 4 und H 10 typisierbar, 6 Stämme konnten nicht serologisch eingeordnet werden.

Andere Autoren (Mc. NICOL und Mc. KILLOP (18); SUTTON und HOBBS (24); AKAMA und OTANI (1); KATSARAS und SIEMS (15)) konnten ebenfalls nicht alle eigenen Stämme den Hobbs-Subtypstämmen zuordnen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die 107 Cl. welchii Typ A-Stämme waren aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien isoliert worden und daraufhin zu prüfen, ob sie in antigener Hinsicht mit den 13 Hobbs-Typstämmen übereinstimmen.

Eine Anzahl von Stämmen (= T-Stämme) war aus Lebensmitteln in der Türkei gewonnen worden, die im Handel feilgeboten wurden. Ein Verdacht auf eine Lebensmittelvergiftung bestand in keinem Fall.

Eine weitere Zahl von Stämmen wurde aus dem Kot gesunder Schlachtschafe gewonnen (= W-Stämme). Es konnte angenommen werden, daß sich unter diesen Stämmen auch hitzeresistente Stämme befanden, und es interessierte ihre serologische Typisierbarkeit.

Außerdem stand eine Zahl von Cl. welchii Typ A-Stämmen aus verschiedenen Instituten zur Verfügung. Die Stämme waren zum größten Teil aus Lebensmitteln bei Lebensmittelvergiftungen isoliert worden (= S-Stämme und I-Stämme). Von Interesse war, ob eine Typisierung bei diesen Stämmen häufiger gelang als bei den anderen Stämmen.

3.1. Stämme

Die 13 Subtypen des Cl. welchii Typ A wurden in lyophilisierter Form von der National Collection of Type Cultures, London, bezogen. Sie dienten der Gewinnung von Antiseren, deren Titer mit der Röhrchenagglutination bei Verwendung homologer Antigene festgestellt wurden.

Die 107 mit den 13 Hobbs-Subtyp-Antiseren getesteten Cl. welchii Typ A-Stämme verteilten sich auf folgende Gruppen:

a) 50 T-Stämme, die in der Türkei aus im Handel angebotenen Fischen, Fleisch und Muscheln isoliert wurden. Bei der Art des Feilhaltens und den dabei herrschenden Temperaturen war mit der Möglichkeit einer Kontamination zu rechnen. Die Stämme lagen in Leber-Leber-Bouillon (Le-Le-Bouillon) vor und waren in Ankara in der Außenstelle des Fachbereiches 8, Veterinärmedizin, der Freien Universität Berlin gewonnen worden.

b) 24 W-Stämme aus Kot gesunder Schlachtschafe.

c) 8 S-Stämme aus verdächtigen Lebensmitteln, isoliert nach dem Vorkommen einer Lebensmittelvergiftung bei Menschen.

d) 8 I-Stämme des Institutes für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin. Die Stämme Nr. 5 und Nr. 9 waren in ihrem Ursprung unbekannt. Die Stämme 601 I, 601 II und 601 III stammten aus dem Institut für Lebensmittelhygiene in Berlin. Die Stämme 283 II, 283 III und 283 IV waren uns vom "Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt" in Aulendorf zur Differenzierung übersandt worden. Sie wurden aus Lebensmitteln bei einer Lebensmittelvergiftung des Menschen isoliert.

e) 20 Z-Stämme aus verschiedenem Probenmaterial:
11 Stämme aus Schweinekot,
3 Stämme aus Schafkot,
4 Stämme aus Futtermitteln,
2 Stämme aus der Erde eines Schweineauslaufes.

Diese Stämme dienten einem Erhitzungsversuch, um in Erfahrung zu bringen, ob auf Hitzeresistenz geprüfte und als "hitzeresistent" beurteilte Cl. welchii Typ A-Stämme besser typisierbar waren als nicht auf Hitzeresistenz geprüfte Stämme.

3.2. Versuchstiere

a) Kaninchen

Für die Gewinnung von Antiseren mit den 13 Subtypen von HOBBS wurden als Versuchstiere klinisch gesunde Kaninchen (Belgische Riesen x Deutsche Schecken) aus der Instituts-zucht verwendet. Sie wurden konventionell gehalten und hatten ein Gewicht von etwa 3,5 kg. Mit jedem Hobbs-Stamm wurden 2 Kaninchen immunisiert.

b) Mäuse

Die für die Testung der Exotoxine einzelner Stämme benötigten Mäuse wurden der NMRI-Institutszucht entnommen. Sie hatten ein Gewicht von 18 - 20 g und wurden konventionell gehalten und gefüttert.

4. TECHNIK UND METHODEN

4.1. Behandlung der 107 Stämme

Die Welchii-Stämme waren teils vor kurzem isoliert, teils über längere Zeit in Le-Le-Bouillon (Tarozzi-Bouillon) unter Paraffinpfropf aufbewahrt worden. Alle Stämme wurden vor ihrer serologischen Prüfung auf Reinheit durch Überimpfung auf Traubenzucker-Schafblutagarplatten (Tr.Bl.Agar) geprüft. Die für das Cl. welchii typischen Einzelkolonien wurden auf Le-Le-Bouillon überimpft und die Kulturen im Kühlschrank aufbewahrt. Soweit sich die Stämme bereits längere Zeit auf Le-Le-Bouillon befanden, wurden sie durch Passagen über Tr.Bl.Agarplatten aktiviert und auf Reinheit geprüft.

Die Zugehörigkeit der Stämme zum Typ A wurde durch den Lecithovitellin-Röhrchentest und Mäuse-Neutralisationsteste sichergestellt. Um diese beiden Teste durchführen zu können, wurde das alpha-Toxin der zu untersuchenden Stämme über Cooked Meat-Medium in Anlehnung an die Arbeit von KATSARAS und HARTWIGK (14) gewonnen. Vor der Beimpfung des Cooked Meat-Mediums wurden diesem 2,5 % einer 25 %igen Dextrinsuspension hinzugefügt. Es schloß sich eine 5stdg. Bebrütung bei 37° C an. Danach wurde die Kulturflüssigkeit 20 Minuten lang bei 5 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Seitz-Filter (E.K. Filter Gr. 3) filtriert.

Als Indikator diente beim Lecithovitellintest eine Eidotteremulsion. Nach MACFARLANE, OAKLEY u... ANDERSON (17) wurde das Dotter eines frischen Hühnereies 10 Minuten lang durch Schütteln in 250 ml physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert und die Emulsion 2 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt, damit sich die gröberen Bestandteile absetzen konnten. Danach wurde der Überstand durch ein Seitz-Filter (E.K. Filter Gr. 3) filtriert.

Bei der Durchführung des Röhrchenlecithovitellintestes wurden die Verdünnungen des Kulturfiltrates in gleicher Weise wie die Verdünnungen des Serums bei der Röhrchenagglutination vorgenommen (s. S.19), so daß sich in jedem Röhrchen, mit Ausnahme des letzten Röhrchens (Kontrollröhrchen), 0,5 ml der einzelnen Filtratverdünnung befanden. In das letzte Röhrchen wurden an Stelle der Kulturfiltratverdünnung 0,5 ml NaCl pipettiert. Zu jedem Röhrchen wurden dann 0,5 ml der gefilterten, aus Eigelb gewonnenen Indikatorflüssigkeit gegeben. Die Röhrchen wurden anschließend 1 Stunde im Wasserbad aufbewahrt und zwischenzeitlich öfters geschüttelt, um sie dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur bis zum Ablesen stehenzulassen.

Als Endtiter der Lecithinaseaktivität galt die Verdünnung, bei der noch eine Opaleszenz nach 24 Stunden feststellbar war. Als Negativkontrolle diente das letzte Röhrchen.

Bei mehreren Stämmen wurde außerdem der Mäuse-Neutralisationstest durchgeführt. Dabei erhielt eine Tiergruppe das Kulturfiltrat mit und eine Tiergruppe ohne Antitoxin des Typs A. Dieser Versuch zeigte bei allen geprüften Stämmen, daß die letale Wirkung durch das A-Antitoxin aufgehoben wurde und daß andere letal wirkende Toxine als das alpha-Toxin von den Stämmen nicht gebildet wurden.

4.2. Behandlung der Hobbs-Stämme

Nach Öffnung der Ampullen der 13 Subtypen von HOBBS wurde Nährbouillon in die Ampulle pipettiert und der Inhalt nach Auflösung auf Le-Le-Bouillon und Tr.Bl.Agarplatten überimpft.

4.3. Gewinnung der Antigene

Zur Gewinnung der Antigene der 13 Hobbs-Stämme wurden die Stämme nach 5 - 6 Passagen über Le-Le-Bouillon auf das CP 2V-Medium nach HAUSCHILD et al. (8) überimpft. Das Medium wurde vor dem Gebrauch jedesmal frisch hergestellt und hatte folgende Zusammensetzung:

2 % Dextrin
2 % Proteose-Pepton
2 % Hefe Extrakt
0,1 % Cystein-HCl
0,2 % Na_2HPO_4
0,1 % K_2HPO_4 ad 1000 ml in Aqua destillata gelöst

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,2 eingestellt. 100 ml dieses Mediums wurden stets in 300 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und diese 2 Stunden bei 100° C sterilisiert.

Nach Abkühlung unter fließendem Leitungswasser folgten die Beimpfung jedes einzelnen Kolbens mit 3 ml einer 24stdg. Le-Le-Bouillon-Kultur und anschließend eine 5stdg. Bebrütung im Exsikkator. Die Vermehrung der Keime ließ sich an der Schaumbildung und starken Trübung des Mediums erkennen. Zwecks Sedimentierung der Bazillen wurde bei 2 000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde dann mit 0,4 %iger formalinisierter NaCl-Lösung aufgeschwemmt, nochmal 1/2 Stunde zentrifugiert und mit Formolkochsalzlösung aufgenommen. Nach abermaliger Zentrifugation wurde das Sediment in Formolkochsalzlösung aufgeschwemmt und 48 Stunden im Kühlschrank stehengelassen. Danach wurde von der gut durchmischten Flüssigkeit 1 ml mit einer Pipette aufgenommen und auf eine Tr.Bl.Agarplatte und ein weiterer ml in ein Le-Le-Bouillon-Röhrchen verbracht, um sicher zu gehen, daß alle Bazillen abgetötet waren.

Die Einstellung der optischen Dichte (= o.D. = 0,13 - 0,25) der Antigene wurde in einem Eppendorf Photometer bei 540 nm

durchgeführt, wobei die nicht beimpfte Formolkochsalzlösung als Blankkontrolle diente. Die Antigene dienten in dieser Dichte für die Immunisierung der Kaninchen sowie für die Röhrchenagglutination.

4.4. Gewinnung der Antiseren

Das Immunisierungsschema war bei den 13 Hobbs-Stämmen folgendes:

Am Anfang wurde jedem Kaninchen 1 ml Antigen des einzelnen Stammes i.v. injiziert. Es folgten 4 weitere Injektionen in 2tägigen Intervallen, wobei die Injektionsdosis bei jeder Injektion um 1 ml erhöht wurde. Die 6. Injektion wurde mit 5 ml 7 Tage nach der 5. Injektion vorgenommen. Die Blutprobenentnahme erfolgte mittels Ohrglocke eine Woche nach der letzten Injektion. Waren die festgestellten Titer nicht hoch genug, wurden weitere Injektionen von je 5 ml zwecks Boosterung durchgeführt. Die Kaninchenseren wurden schließlich mit Thiomerosal (1 : 10 000) konserviert und in Plastikfläschchen zu je 100 ml bei +5° C aufbewahrt.

4.5. Röhrchenagglutination

Die Technik der Röhrchenagglutination entsprach den Vorschlägen von HALL et al. (7).

11 A-Röhrchen wurden mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung (pH 7) beschickt. Dann wurden in das 1. Röhrchen 0,5 ml des Hobbs-Antiserums pipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden 0,5 ml aus dem 1. Röhrchen entnommen und auf das 2. Röhrchen übertragen. Nach guter Durchmischung wurden 0,5 ml aus dem 2. Röhrchen entnommen und auf das 3. Röhrchen übertragen. In gleicher Weise erfolgte die Übertragung auf die weiteren Röhrchen bis zum 10. Röhrchen, aus dem 0,5 ml des Serum-Kochsalzgemisches verworfen wurden. Es

entstanden so die Serumverdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 1 024. Das 11. Röhrchen erhielt 0,5 ml NaCl und diente als Antigenkontrolle. Allen 11 A-Röhrchen wurden im 2. Arbeitsgang 0,5 ml des Antigens der einzelnen Stämme zugegeben. Durch Benutzung eines Vortex-Rührers wurde für eine gute Durchmischung gesorgt.

Die Gestelle mit den Röhrchen blieben zunächst 2 Stunden im Wasserbad bei 37° C, um dann über Nacht bei Raumtemperatur (+20 - 25° C) stehenzubleiben. Vor dem Ablesen der Reaktionen wurden die Röhrchen 10 Minuten lang bei 250 x g zentrifugiert.

Für die Beurteilung wurde folgendes Schema zugrunde gelegt:

++++ = vollständige Agglutination:
Klarer Überstand und Bodensatz auf der gesamten Fläche der Röhrchenkuppe. Nach leichtem Aufschütteln Aufwirbeln des Bodensatzes in körnigen Flocken.

+++ = deutliche Agglutination:
Klarer Überstand, Boden bedeckt nicht die ganze Kuppenfläche. Nach leichtem Schütteln wirbeln Flocken auf.

++ = mäßig stark ausgeprägte Agglutination:
Überstand etwas trübe, Bodensatz deutlich erkennbar, bedeckt nicht die ganze Fläche der Kuppe, bei leichtem Schütteln Verteilung der Flocken in der Flüssigkeit.

+ = schwach ausgeprägte Agglutination:
Trübung der Überstandes, Sediment reicht geringgradig über den tiefsten Punkt der Kuppe hinaus. Bei leichtem Schütteln gleichmäßige Verteilung des Sedimentes in der Flüssigkeit.

- = keine Agglutination:
Starke Trübung des Überstandes, Absatz des Sedimentes im tiefsten Punkt der Kuppe als Häufchen. Bei Schräghalten des Röhrchens läuft das Sediment aus. Es läßt sich bei leichtem Schütteln gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilen.

Als Endtiter wurde die Serumverdünnung gewertet, bei der noch eine ++ Reaktion festgestellt werden konnte.

Wurde in dem Kontrollröhrchen eine Agglutination festgestellt, so lag eine Autoagglutination vor. In diesem Fall wurde das Ergebnis der Agglutination nicht gewertet und der Versuchsansatz wiederholt. Nicht bei allen Stämmen konnte das Ergebnis der Agglutination beim ersten Ansatz zweifelsfrei beurteilt werden. Durch mehrmalige Wiederholung des Agglutinationsversuches wurde in diesen Fällen versucht, zu einem eindeutigen Ergebnis zu kommen.

4.6. Technik des Erhitzungstestes

a) Erhitzung im Untersuchungsmaterial

Um hitzeresistente A-Stämme zu gewinnen, wurden 32 Proben von Tierkot, Erde und Futtermitteln einer Erhitzung im Wasserbad unterzogen. Das Untersuchungsmaterial wurde zunächst in Pepton-Kochsalzlösung aufgeschwemmt (0,85 % NaCl und 0,10 % Pepton). Hierzu wurden 10 g des Untersuchungsmaterials in 200 ml Pepton-Kochsalzlösung in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und 30 Minuten lang mit einem Magnetrührer homogenisiert. Nach 10 Minuten langem Absetzenlassen wurden aus jedem Kolben 10 ml des Überstandes in sterile Reagenzröhrchen pipettiert. Die Überstände wurden dann in ein kochendes Wasserbad verbracht. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Röhrchen vollkommen vom kochenden Wasser bedeckt waren.

Für alle Proben war eine 2minütige Vorlaufzeit vorgesehen. Erst nach dieser Zeit wurde die Erhitzungsdauer gewertet. Sie betrug 15, 30, 60 und 120 Minuten. Nach Ablauf der Erhitzungszeit wurden die Röhrchen im Eiswasser gekühlt. Dann wurde vom Inhalt 1 ml mit der Pipette entnommen und auf je eine SFP-Platte nach SHAHIDI und FERGUSON (23) überimpft und mit Drigalskispatel gleichmäßig auf die Oberfläche

verteilt. Der Beimpfung schloß sich eine Überschichtung der Nährbodenoberfläche mit 10 ml gewöhnlichen, verflüssigten und auf 57° C abgekühlten Agars an. Eine Bebrütung erfolgte im Brutschrank 24 Stunden lang bei 37° C.

Soweit Sporen von Cl. welchii den Erhitzungsprozeß überstanden hatten, waren die Welchii-Kolonien durch ein schwarzes Zentrum von Stecknadelkopf- bis Linsengröße und einen aufgehellten, milchigen Hof, der durch die Lecithinaseaktivität entstanden war, erkennbar.

b) Erhitzung von Kulturstämmen

5 Lebensmittelstämme ("S-Stämme") wurden zwecks Hitzeresistenzprüfung auf das Sporulationsmedium nach DUNCAN und STRONG (5) überimpft und 40 Stunden lang bei 37° C bebrütet. 10 ml der Flüssigkultur wurden dann entnommen und in gleicher Weise, wie vorher beschrieben, einer Erhitzung bei Kochtemperatur unterzogen.

Zur Prüfung, ob Sporen die Erhitzung von 100° C überstanden hatten, wurde 1 ml des Mediums auf je eine Tr.Bl.Agar und Le-Le-Bouillon überimpft. Es schloß sich eine 24stdg. Bebrütung unter Anaerobiose an. Ein Wachstum typischer Cl. welchii-Kolonien zeigte an, daß die Sporen die Erhitzung überlebt hatten.

4.7. Homologe Endtiter der mit den 13 Hobbs-Typstämmen hergestellten Antiseren

Zunächst interessierte die Frage, welche Agglutinationstiter die mit den 13 Hobbs-Typstämmen immunisierten Kaninchen erzielt hatten. Die Endtiterstufen schwankten zwischen 1 : 64 und 1 : 512, wenn nur die Höchsttiter eines der beiden mit je einem Stamm immunisierten Kaninchen zugrunde gelegt wurden.

Die reziproken Höchsttiter der Kaninchenseren sind in nachstehender Übersicht zusammengestellt:

Hobbs-Typstamm Nr.:	1	2	3	4	5	6
Reziproke Titer :	512	256	128	512	512	256

Hobbs-Typstamm Nr.:	7	8	9	10	11	12	13
Reziproke Titer :	256	64	256	128	128	512	512

Schwache Mitreaktionen wurden lediglich bei dem Antiserum Hobbs 12 gegenüber den Antigenen Hobbs 5 und Hobbs 9 bei den Verdünnungsstufen 1 : 32 festgestellt. Die Antiseren Hobbs 5 und 9 agglutinierten das Hobbs 12-Antigen jedoch nicht.

5. ERGEBNISSE

5.1. Bewertungsnormen für die Ergebnisse der Agglutination

107 Cl. welchii-Stämme wurden darauf geprüft, ob sie antigen mit einem oder mehreren der 13 vorläufigen Hobbs-Typstämme (provisional subtypes) übereinstimmten.

Von den 107 Stämmen wurden 25 Stämme (20 Z- und 5 S-Stämme) auf Hitzeresistenz untersucht.

Die Bewertung der Agglutinationsergebnisse erfolgte zunächst in der Weise, daß zweifelsfreie positive Agglutinationen in Verdünnungen der 13 Antiseren von 1 : 32 und darüber für eine antigene Übereinstimmung des Prüfstammes mit dem jeweiligen Hobbs-Subtypstamm gewertet wurden (= 1. Bewertungsgrundlage). Die gleiche Bewertung wendeten MIZUKAMI und TOMIKAWA (20) an, wobei allerdings die Objektträgeragglutination durchgeführt wurde.

Da diese Bewertung für eine Erkennung einer Antigengleichheit nicht geeignet zu sein schien, wurden die positiv reagierenden Untersuchungsstämme noch darauf geprüft, ob sie die homologen Endtiter der Hobbs-Subtypstämme erreichten (= 2. Bewertungsgrundlage).

War dies nicht ganz der Fall und lagen die Titerstufen der zu untersuchenden Stämme eine Titerstufe niedriger oder höher, so wurde angenommen, daß eine antigene Übereinstimmung vorliegen könnte (= 3. Bewertungsgrundlage).

5.2. 50 T-Stämme

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Zahl der von den T-Stämmen erreichten Endtiter bei Testung mit den 13 Hobbs-Antiseren

Hobbs-Antiserum	Endtiter		
	1 : 32	1 : 64	1 : 128
H 1	5	4	1
H 2	8	3	1
H 3	2	-	1
H 4	-	1	-
H 5	1	-	1
H 6	1	2	-
H 8	1	-	-
H 9	4	-	1
H 12	3	-	1
H 13	4	3	-
Insgesamt	29	13	6

Anmerkung: In dieser und den folgenden Tabellen sind Doppel- und Dreifachreaktionen mitaufgeführt

Insgesamt reagierten 40 Stämme bei den Titern 1 : 32 bis 1 : 128 positiv. Hiervon reagierten 35 Stämme mit je 1 Antiserum, 2 Stämme mit je 2 Seren und 3 Stämme mit je 3 Seren positiv. Mit den Hobbs-Seren H 7, H 10 und H 11 reagierte kein Stamm in der Verdünnung 1 : 32 und darüber positiv. 1 T-Stamm wurde durch das Hobbs-Antiserum H 3 bis zur Höhe des homologen Endtiters (1 : 128) agglutiniert, alle anderen Stämme erreichten die Endtiter der Hobbs-Stämme nicht. 3 T-Stämme reagierten mit den Hobbs-Seren H 2, H 8 und H 9 um eine Verdünnungsstufe niedriger als die homologen Hobbs-Typstämme.

10 Stämme zeigten mit den 13 Hobbs-Antiseren keine Agglutionationen. Am häufigsten waren positive Reaktionen in der Verdünnungsstufe 1 : 32. Die Antiseren H 1, H 2, H 9 und H 13 agglutinierten die Stämme am häufigsten.

5.3. 21 W-Stämme

Diese Stämme wurden aus frischem Schafkot isoliert und nicht auf Hitzeresistenz überprüft. Das Ergebnis der serologischen Untersuchungen siehe Tabelle 2.

Tab. 2: Zahl der von den W-Stämmen erreichten Endtiter bei Testung mit den 13 Hobbs-Antiseren

Hobbs-Antiserum	Endtiter			
	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
H 1	3	-	3	2
H 2	1	-	1	-
H 3	1	-	1	-
H 4	1	-	-	-
H 6	1	-	-	1
H 9	-	-	1	-
H 10	1	-	-	-
H 11	1	-	-	1
H 12	1	-	-	-
Insgesamt	10	-	6	4

Anmerkung siehe Tabelle 1

18 Stämme wurden durch die Hobbs-Antiseren in den Titerstufen 1 : 32 und mehr agglutiniert. Davon zeigten 15 Stämme Agglutinationen mit 1 Hobbs-Antiserum. 1 Stamm reagierte mit 2 Hobbs-Antiseren, 1 Stamm reagierte mit 3 Hobbs-Antiseren positiv. 4 Stämme wurden durch die 13 Hobbs-Antiseren nicht

agglutiniert. Kein W-Stamm zeigte mit den Hobbs-Antiseren H 5, H 7 und H 8 positive Reaktionen.

Bei 2 W-Stämmen wurden mit dem Hobbs-Serum H 3 und dem Hobbs-Serum H 6 die homologen Endtiter von 1 : 128 und 1 : 256 erreicht. 1 Stamm reagierte in der Verdünnungsstufe 1 : 256 positiv und übertraf damit den homologen Titer des Hobbs-Teststammes H 11 um eine Verdünnungsstufe. 4 W-Stämme agglutinierten die Hobbs-Antiseren H 1, H 2, H 9 und H 11 um eine Verdünnungsstufe niedriger als der homologe Hobbs-Stamm.

5.4. 8 S-Stämme

Von 5 auf Hitzeresistenz geprüften S-Stämmen, die aus Lebensmitteln in Fällen von Lebensmittelvergiftungen bei Menschen isoliert wurden, überstanden 4 Stämme eine Erhitzung von 100° C für 120 Minuten.

Unter Zugrundelegung des Titers von 1 : 32 und mehr waren davon 4 Stämme den Hobbs-Subtypstämmen serologisch nicht zuzuordnen. Auch ein nicht auf Hitzeresistenz geprüfter S-Stamm verhielt sich bei der Agglutination mit allen Hobbs-Antiseren negativ. Der 5. S-Stamm, der auf Hitzeresistenz geprüft war, reagierte mit dem Hobbs-Serum H 3 bis zu dem Endtiter 1 : 256 positiv und übertraf den homologen Endtiter um eine Verdünnungsstufe. Dieser Stamm überstand eine 30 Minuten dauernde Erhitzung bei 100° C.

2 nicht auf Hitzeresistenz geprüfte S-Stämme, die ebenfalls aus Lebensmitteln in Fällen von Lebensmittelvergiftungen bei Menschen isoliert wurden, reagierten mit je einem Hobbs-Serum (H 1 bzw. H 3) positiv bis zu den Titern 1 : 256 bzw. 1 : 64. Beide Titer lagen um eine Stufe niedriger als die Endtiter bei den homologen Hobbs-Stämmen.

5.5. 8 I-Stämme

Diese Stämme waren Institutsstämme, deren Ursprung bei 6 Stämmen, die aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen bei Menschen stammten, bekannt war.

Tab. 3: Zahl der von den I-Stämmen erreichten Endtiter bei Testung mit den 13 Hobbs-Antiseren

Hobbs-Antiserum	Endtiter	
	1 : 32	1 : 64
H 1	1	-
H 2	2	-
H 3	1	1
H 4	1	-
H 12	2	2
Insgesamt	7	3

Anmerkung siehe Tabelle 1

Bei der serologischen Überprüfung zeigten alle Stämme bei Zugrundelegung des Titers 1 : 32 und mehr positive Reaktionen mit den Antiseren H 1, H 2, H 3, H 4 und H 12 in den Verdünnungsstufen 1 : 32 und 1 : 64. Jedoch erreichte keiner dieser Stämme die Endtiter der homologen Hobbs-Antigene. 1 I-Stamm reagierte in der Verdünnungsstufe 1 : 64 positiv und lag damit eine Stufe unter dem homologen Endtiter des Hobbs-Subtypstammes H 3. 7 Stämme reagierten mit je 1 Hobbs-Antiserum und 1 Stamm mit 3 Hobbs-Antiseren (H 1, H 3, H 4) positiv.

5.6. 20 Z-Stämme

Von den aus Kot, Erde und Futtermitteln isolierten Z-Stämmen überstanden

2 Stämme eine 60 Minuten lange Erhitzung bei 100° C
7 " " 30 " " " " 100° C
11 " " 15 " " " " 100° C

Tab. 4: Zahl der von den Z-Stämmen erreichten Endtiter bei Testung mit den 13 Hobbs-Antiseren

Hobbs-Antiserum	Endtiter		
	1 : 32	1 : 64	1 : 128
H 1	2	4	3
H 2	2	1	1
H 4	-	-	1
H 9	-	1	-
H 10	1	-	-
H 11	-	1	-
H 12	1	2	-
H 13	-	1	-
Insgesamt	6	10	5

Anmerkung siehe Tabelle 1

Alle 20 Stämme reagierten bei dem Titer 1 : 32 und mehr mit den 13 Hobbs-Antiseren positiv. 19 Stämme wurden durch je 1 Hobbs-Antiserum agglutiniert. 1 Stamm reagierte mit 2 Hobbs-Antiseren positiv.

Kein Z-Stamm erreichte die Endtiter der homologen Hobbs-Antigene. 2 Z-Stämme agglutinierten mit den Hobbs-Antiseren H 2 und H 11 um eine Verdünnungsstufe niedriger als der homologe Hobbs-Subtypstamm.

6. DISKUSSION

Bei den Untersuchungen war die Wertigkeit der eigenen Antiseren, die mit den 13 Hobbs-Typen über Kaninchen hergestellt wurden, von besonderer Bedeutung. Diese Antiseren waren in der Wertigkeit den Antiseren von HOBBS et al. (12) gering unterlegen. Dies kann sich dadurch erklären, daß die Gewinnung der Antiseren nicht völlig der von HOBBS et al. (12) angegebenen Technik entsprach. Für die Vermehrung der Bazillen wurde nicht Glukosebrühe, sondern das CP 2v-Medium nach HAUSCHILD et al. (8) verwendet. Weiterhin wurde die Bebrütungszeit des beimpften CP 2v-Mediums auf 5 Stunden im Exsikkator bemessen, während HOBBS et al. die Bebrütung über Nacht vornahmen. Diese Verkürzung der Bebrütungszeit schien mir gerechtfertigt zu sein, weil das Bakterienwachstum und die alpha-Toxinproduktion nach GALE und van HEYNINGEN (6) zwischen der 4. und 5. Stunde ihr Maximum erreichen. Die Bakterienvermehrung bleibt nach den Untersuchungen der Autoren von der 4. Stunde an auf gleicher Höhe, während die Toxinproduktion nach der 4. Bebrütungsstunde schon absinkt. Somit war bei Verwendung einer optimalen Nährbrühe damit zu rechnen, daß die Ausbeute an Keimzellen für eine Immunisierung von Kaninchen ausreichen würde.

Die Technik der Agglutination war die gleiche wie bei HALL et al. (7). Sie beruhte im wesentlichen auf Einhaltung bestimmter Aufbewahrungszeiten, Aufbewahrungstemperaturen nach Ansetzen der Agglutination sowie einer Zentrifugation kurz vor dem Ablesen der Reaktion.

Die Bewertung der Agglutinationsergebnisse war mitunter schwierig, weil sich das Sediment nicht immer in der Kuppe der Röhrchen scharf absetzte und beim Schütteln oft nicht körnig aufwirbelte. Durch Wiederholungen der Agglutinationsversuche wurde in diesen Fällen versucht, den Endpunkt der Agglutination eindeutig zu bestimmen.

Bei den ihrem Ursprung nach heterogenen Stämmen interessierte die Frage, ob A-Stämme, die aus im Handel angebotenen Lebensmitteln, Kot klinisch gesunder Tiere, Erde und Futtermitteln isoliert worden waren, mit den Hobbs-Stämmen überhaupt typisierbar waren. Zum Vergleich mit den Ergebnissen dieser Stämme standen wenige A-Stämme aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen beim Menschen zur Verfügung.

Auf eine Vorprüfung aller A-Stämme auf Hitzeresistenz, Sporulation und schwache Toxinproduktion, die anfangs für A-Stämme aus Lebensmittelvergiftungsfällen typisch sein sollten, wurde verzichtet, da sich später herausstellte, daß Lebensmittelvergiftungen beim Menschen auch durch Stämme hervorgerufen werden können, die diese Eigenschaften nicht besitzen.

Die größte Zahl der Stämme war bereits mehrere Male über Nährböden passagiert worden, ehe sie untersucht wurden. Es war daher anzunehmen, daß die Stämme ihre ursprünglichen Eigenschaften gegenüber einer Erhitzung verloren hatten. Denn nach HOBBS et al. (12) können A-Stämme, die anfangs hitzeresistent waren, diese Eigenschaft nach Passagierung über Nährböden verlieren.

Nachdem auch in Fällen von Lebensmittelvergiftungen hitzelabile A-Stämme ermittelt wurden (SUTTON und HOBBS (24); HAUSCHILD und THATCHER (9)), schien es gerechtfertigt zu sein, die Mehrzahl der Stämme nicht auf Sporulationsfähigkeit und Hitzeresistenz zu prüfen. Der Nachweis, daß es sich in allen Fällen um A-Stämme handelte, wurde durch den Lecithovitellin- und Mäuse-Neutralisationstest erbracht.

Bei der Bewertung der serologischen Untersuchungsergebnisse wurde zunächst davon ausgegangen, daß eine antigene Übereinstimmung mit einem der 13 Hobbs-Subtypen anzunehmen war, wenn ein Stamm durch eines der 13 Antiseren in der Serumverdünnung 1 : 32 und mehr agglutiniert wurde. Bei dieser Bewertung ließen sich 89 Stämme in die 13 Hobbs-Stämme

einordnen, das sind 83,2 % aller Stämme. Übergreifende Reaktionen wurden bei 9 Stämmen (= 8,4 %) beobachtet, und zwar reagierten 4 Stämme mit je 2 und 5 Stämme mit je 3 Hobbs-Seren positiv.

Wurde die Bewertung dahingehend eingeschränkt, daß eine antigene Übereinstimmung nur dann bestand, wenn die Untersuchungsstämme die homologen Titer der 13 Hobbs-Stämme erreichten, so ergab sich nur für 3 Stämme eine Einordnungsmöglichkeit, und zwar für 1 T-Stamm und 2 W-Stämme. Rechnet man zu den 3 Stämmen noch diejenigen hinzu, die durch die Hobbs-Antiseren um eine Verdünnungsstufe tiefer oder höher als der homologe Hobbs-Stamm agglutiniert wurden, so ergab sich eine Antigengleichheit bei insgesamt 19 Stämmen (= 17,8 %). Von diesen lagen 2 Stämme (1 S-Stamm und 1 W-Stamm) über und 14 Stämme eine Stufe unter den homologen Endtitern (4 T-Stämme, 2 S-Stämme, 1 I-Stamm, 5 W-Stämme, 2 Z-Stämme).

Nur einer dieser 19 Stämme, ein W-Stamm, zeigte eine übergreifende Reaktion. Er wurde mit dem Hobbs-Typserum H 6 bei dem homologen Titer 1 : 256 agglutiniert, reagierte aber außerdem mit dem Hobbs-Typserum H 1 in der Verdünnungsstufe 1 : 128 positiv. Der Stamm wurde dem Hobbs-Stamm H 6 zugeordnet.

Wenn auch die Typisierbarkeit von A-Stämmen nicht davon abhängig ist, daß sie hitzeresistent sind, so wurde doch bei der Bewertung der Agglutinationsergebnisse zwischen Stämmen, die ein Kochen von 15 Minuten und länger überstehen, und Stämmen, die nicht auf Hitzeresistenz geprüft wurden, unterschieden. 25 Stämme erwiesen sich in diesem Falle als "hitzeresistent". 20 Stämme waren Z-Stämme, 5 Stämme waren S-Stämme. Von diesen Stämmen ließen sich 3 Stämme (= 12 %) den 13 Hobbs-Subtypstämmen zuordnen (= 2 Z-Stämme und 1 S-Stamm). Bei 17 Stämmen war eine Zuordnung nicht möglich. Die 2 Z-Stämme wurden durch die Hobbs-Antiseren H 2 und

H 11 agglutiniert, wobei sie den Endpunkt der homologen Stämme nicht ganz erreichten, d.h. um eine Stufe niedriger reagierten. Die Stämme waren aus Schweinekot isoliert. Der eine S-Stamm reagierte mit dem Hobbs-Serum H 3 um eine Titerstufe höher als der homologe Hobbs-Stamm. Er war aus einem Lebensmittel bei einer Lebensmittelvergiftung isoliert worden und überlebte ein 30 Minuten langes Kochen, wurde aber durch ein 1stdg. Kochen abgetötet.

Den 25 "hitzeresistenten" Stämmen standen 82 nicht auf Hitzeresistenz geprüfte Stämme gegenüber. Bei gleichem Bewertungsmaßstab konnten 16 Stämme (= 19,5 %) dieser Gruppe typisiert werden. Wenn man berücksichtigt, daß sich unter den 82 Stämmen auch "hitzeresistente" Stämme befunden haben dürften, so besteht in der Häufigkeit der Typisierbarkeit bei beiden Stammgruppen kein großer Unterschied.

4 S-Stämme, aus Lebensmitteln bei Lebensmittelvergiftungen isoliert, überstanden ein Kochen während 120 Minuten. Trotzdem war es mit der angewandten Technik nicht möglich, die Stämme einem der 13 Subtypstämme von HOBBS serologisch zuzuordnen. Daraus kann man wohl den Schluß ziehen, daß die Hitzeresistenz für die Typisierbarkeit nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen wurden noch daraufhin überprüft, wie sich "hitzeresistente" und nicht auf Hitzeresistenz geprüfte Stämme verhielten, wenn eine Antigengleichheit bei einer positiven Agglutination bei einem Titer von 1 : 32 und mehr angenommen wurde. Bei dieser Bewertung konnten von den 25 "hitzeresistenten" Stämmen 21 (= 82,2 %) einem oder mehreren Hobbs-Antiseren zugeordnet werden. Von den 82 nicht auf Hitzeresistenz geprüften Stämmen waren 68 (= 82,9 %) typisierbar. Mithin ergab sich bei dieser Bewertung ebenfalls, daß "hitzeresistente" und nicht auf Hitzeresistenz geprüfte Stämme in der Typisierbarkeit mit den 13 Hobbs-Antiseren keine Unterschiede aufweisen.

Auch die Herkunft der Stämme spielt keine Rolle für die Typisierbarkeit. Vor allem ließ sich nicht beweisen, daß Lebensmittelvergiftungsstämme besser typisierbar sind als Stämme, die aus Erde, Futtermitteln oder Tierkot isoliert worden waren.

Bei einer Typisierung mit den 13 Hobbs-Antiseren scheint wichtig zu sein, daß die zu typisierenden A-Stämme nahezu gleichhohe Titer wie die homologen Stämme zeigen, d.h. mit einer Antigengleichheit dürfte auch dann zu rechnen sein, wenn die Stämme um eine Stufe höher oder eine Stufe niedriger als der homologe Stamm agglutiniert werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Von 107 A-Stämmen unterschiedlichen Ursprungs konnten 3 Stämme den 13 Hobbs-Subtypen zugeordnet werden, wenn eine Typgleichheit bei Erreichen der homologen Endtiter der 13 Subtypstämme von HOBBS angenommen wurde. Es handelte sich um 1 Stamm, der in der Türkei aus einem unverdächtigen Lebensmittel isoliert worden war, und 2 Stämme, die aus Schafkot gewonnen worden waren.

2. Wurde eine Antigengleichheit auch dann angenommen, wenn die A-Stämme eine Stufe höher oder eine Stufe niedriger agglutiniert wurden als die homologen Hobbs-Subtypstämme, erwiesen sich 19 der 107 Stämme typisierbar. Unter diesen 19 Stämmen waren 4 Stämme, die aus Fällen von Lebensmittelvergiftungen beim Menschen stammten (3 S-Stämme, 1 I-Stamm).

3. A-Stämme, die ein 15 Minuten langes Kochen überstanden, ließen sich nicht besser typisieren als Stämme, die nicht auf Hitzeresistenz geprüft worden waren.

4. A-Stämme, die aus Lebensmitteln bei einer Lebensmittelvergiftung isoliert worden waren, ließen sich nicht besser typisieren als Stämme, die aus im Handel angebotenen Lebensmitteln oder aus Futtermitteln, Erde und Tierkot isoliert worden waren.

5. 4 A-Stämme, die aus Lebensmitteln anläßlich einer Lebensmittelvergiftung stammten, überstanden ein Kochen von 120 Minuten. Sie konnten bei der verwendeten Technik im Gegensatz zu einem anderen Lebensmittelstamm, der nur ein Kochen von 30 Minuten überstand, nicht den 13 Hobbs-Subtypstämmen zugeordnet werden.

6. Für eine Typisierung von A-Stämmen mit den 13 Subtyp-

Antiseren nach HOBBS et al. wird die Durchführung der Röhrchenagglutination empfohlen, weil nur dieses Verfahren eine Antigengleichheit erkennen läßt.

8. SUMMARY

STUDIES ON SEROLOGICAL CLASSIFICATION OF 107 CLOSTRIDIUM WELCHII (PERFRINGENS) TYPE A STRAINS OF DIFFERENT ORIGIN BY 13 HOBBS PROVISIONAL SUBTYPE STRAINS

1. 3 out of 107 Clostridium welchii type A strains of different origin were typable by 13 Hobbs provisional subtype strains under the condition that the final titers of the homologous 13 Hobbs subtype strains were reached. By this method it was possible to classify 3 strains into the 13 Hobbs subtype strains. These 3 strains were out of a number of 107 Cl. welchii type A strains of different origin. One of these 3 strains was isolated from foodstuff in Turkey, the 2 remaining ones were isolated from feces of sheep.

2. By this way 19 out of 107 strains were typable if an equality of antigens was supposed that A strains were agglutinated at one dilution higher or at one dilution below the homologous titer of the Hobbs subtype strains. Among the 19 strains 4 strains were isolated on the occasion of human food poisoning (3 G-strains, 1 I-strain).

3. Cl. welchii type A strains surviving boiling for 15 minutes were not found to be better typable than strains not proved to be heat resistant.

4. Cl. welchii type A strains isolated from foodstuff on the occasion of human food poisoning seemed not to be typable at a higher rate than strains isolated from foodstuff offered on the market, from feed, soil, or feces of sheep.

5. 4 Cl. welchii type A strains isolated from foodstuff on the occasion of human food poisoning survived boiling

for 120 minutes. It was not possible to adjoin these strains to the 13 Hobbs subtype strains. That is in contrast to another strain isolated from foodstuff, surviving only a 30 minutes' boiling.

6. When typability of Cl. welchii A strains is supposed by 13 Hobbs subtype strains, tube agglutination tests are recommended because they guarantee best to perceive antigenic equality.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKAMA, K. u. S. OTANI (1970):
Clostridium perfringens as the flora in the intestine of healthy persons
Jap. J. Med. Sci. Biol. 23, 161-175

2. BAUMGART, J., Y. ASAKAWA u. H. HECHELMANN (1971):
Eine durch hitzeempfindliche ß-haemolytische Clostridium perfringens-Stämme - Hobbs Typen 1 und 4 - verursachte Lebensmittelvergiftung
Arch. Lebensmittelhyg. 22, 7-11

3. DISCHE, F.E. u. S.D. ELEK (1957):
Experimental food poisoning by Clostridium welchii
Lancet 2, 71

4. DOWELL, jr., V.R. u. D.N. WHALEY (1971):
Serotypes of Clostridium perfringens associated with foodborne disease in the United States
Bact. Proc., S. 112

5. DUNCAN, C.L. u. D.H. STRONG (1968):
Improved medium for sporulation of Clostridium perfringens
Appl. Microbiol. 16, 82-89

6. GALE, E.F. u. W.E. van HEYNINGEN (1942):
The effect of the pH and presence of glucose during growth on the production of α- and θ-toxins and hyaluronidase by Clostridium welchii
Biochem. J. 36, 624

7. HALL, H.E., R. ANGELOTTI, K.H. LEWIS u. M.J. FOTER (1963):
Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with food and foodborne disease
J. Bact. 85, 1094

8. HAUSCHILD, A.H.W., R. HILSHEIMER u. F.S. THATCHER (1967):
Acid resistance and infectivity of food-poisoning Clostridium perfringens
Can. J. Microbiol. 13, 1041-1047

9. HAUSCHILD, A.H.W. u. F.S. THATCHER (1967):
Experimental food poisoning with heat-susceptible Clostridium perfringens type A
J. Food Sci. 32, 467

10. HAYASHI, K. (1961):
A mass food poisoning affair caused by Clostridium welchii, Hobbs type 2
Endemic Disease Bull., Nagasaki Univ. 3: 1-9

11. HENDERSON, D.W. (1940):
The somatic antigens of the Cl. welchii group of organisms
J. Hyg. Camb. 40, 501

12. HOBBS, B.C., M.E. SMITH, C.L. OAKLEY, G.H. WARRACK u. J.C. CRUICKSHANK (1953):
Clostridium welchii food poisoning
J. Hyg. Camb. 51, 75

13. HOBBS, B.C. (1965):
Clostridium welchii as a food poisoning organism
J. Appl. Bact. 28, 74-82

14. KATSARAS, K. u. H. HARTWIGK (1973):
Studien über die immunogene Wirkung verschiedenartig präparierter Toxine des Clostridium welchii (perfringens) Typ A ohne und mit inkomplettem Freundschen Adjuvans bei Kaninchen und Schafen
Zbl. Vet. Med. B. 20, 547-557

15. KATSARAS, K. u. H. SIEMS (1974):

Enterotoxin-Nachweis bei hitzeresistenten Stämmen von Clostridium perfringens Typ A aus einer Lebensmittelvergiftung

Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 229, 409-420

16. Mc. CLUNG, L.S. (1945):

Human food poisoning due to growth of Clostridium perfringens (C. welchii) in freshly cooked chicken: preliminary note

J. Bact. 50, 229-231

17. MACFARLANE, R.G., C.L. OAKLEY u. C.G. ANDERSON (1941):

Haemolysis and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by the alpha toxin of Clostridium welchii

J. Path. Bact. 52, 99

18. Mc. NICOL, M. u. E.J. Mc. KILLOP (1958):

Food-poisoning caused by Clostridium welchii in cold chicken

Lancet 1, 787

19. Mc. KILLOP, E.J. (1959):

Bacterial contamination of hospital food with special reference to Clostridium welchii food poisoning

J. Hyg. 57, 31

20. MIZUKAMI, T. u. M. TOMIKAWA (1970):

On the heat resistant strains of Clostridium perfringens isolated in Hong Kong

Jap. J. Med. Sci. Biol. 23, 103-104

21. NISHIDA, S., N. SEO u. M. NAKAGAWA (1969):

Sporulation, heat resistance, and biological properties of Clostridium perfringens

Appl. Microbiol. 17, 303-309

22. RODWELL, A.W. (1941):
Serological subtypes in Cl. welchii types A, B, C, and D
Austral. Vet. J. 17, 58

23. SHAHIDI, S.A. u. A.R. FERGUSON (1971):
New quantitative, qualitative, and confirmatory media of rapid analysis of food for Clostridium perfringens
Appl. Microbiol. 21, 500

24. SUTTON, R.G.A. u. B.C. HOBBS (1968):
Food poisoning caused by heat sensitive Clostridium welchii. A report of five recent outbreaks
J. Hyg. 66, 135

25. TURNER, G.C. u. M.M. WONG (1961):
Intestinal excretion of heat resistant Cl. welchii in Hong Kong
J. Path. Bact. 82, 529-531

26. WILLIS, A.T. (1969):
Clostridia of wound infection
Butterworths, London. S. 115

Für die Überlassung des Themas und für die immer erwiesene großzügige Unterstützung sei an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Hans Hartwigk herzlich gedankt.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere bei Herrn Dr. Konstantin Katsaras, für die Unterstützung und die erwiesene Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 27. November 1934 wurde ich, Hinrich Thiede, als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Karl Thiede und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Kiele, in Stettin geboren.

1941 wurde ich eingeschult. 1945 verließen wir Stettin und gingen nach Stralsund. Von dort siedelten wir 1949 nach Wuppertal über. Hier besuchte ich eine Realschule und erhielt 1953 das Abschlußzeugnis dieser Schule.

Nach der kaufmännischen Lehre bei der Firma "Hagerbo" in Mettmann bei Düsseldorf trat ich in den Außendienst dieser Firma ein.

Nachdem ich das Abendgymnasium für berufstätige Erwachsene in Düsseldorf besucht hatte, legte ich 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Sommer 1967 nahm ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität in Berlin auf, bestand 1969 das Physikum und beendete das Studium 1972 mit dem Staatsexamen.

Seit Januar 1973 arbeite ich an der Dissertationsarbeit in der Fachrichtung Mikrobiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3 12 88 85 - 3 13 81 98